**BIOLOGIA CELULAR VETERINARIA**

**PRACTICA # 3**

**TINCIÓN DE GRAM Y MORFOLOGIA DE CELULAS PROCARIOTAS**

**INTRODUCCION**

Dado que los componentes celulares y especialmente el citoplasma son usualmente transparentes, es necesario teñir a las células o microorganismos antes de observarlos al microscopio con reactivos especiales. Como preparación para la técnica de tinción, una pequeña muestra de células se coloca en el portaobjetos y se “fija” a él, ya sea secándola con aire o con calor (utilizando un mechero).

Tenemos dos tipos básicos de tinciones: **las tinciones simples**, que utilizan un solo tipo de colorante (por ejemplo, cristal violeta y azul de metileno) cuya carga positiva es tarida por la carga negativa de las células. **Las tinciones diferenciales** permiten distinguir entre dos tipos diferentes de células.

La tinción diferencial requiere más de un tipo de colorante y se utiliza para distinguir entre varios tipos de células bacterianas. Una tinción diferencial típicamente consiste de tres pasos principales: primero un colorante primario, el cual se utiliza para teñir a todas las células en la tinción; enseguida un paso de decoloración, el cual remueve el colorante solo de ciertos tipos de células y finalmente un colorante de contraste, el cual tiñe las células recién decoloradas pero no tiene efecto sobre las células que aún retienen el colorante primario.

La tinción propuesta por el médico danés Christian Gram en 1884, es una de las tinciones diferenciales más utilizadas en bacteriología, que clasifica los cultivos bacterianos de menos de 24 horas en Gram positivas y Gram negativas. La reacción de la tinción de Gram se basa en la cantidad de peptidoglucano que se encuentra en las paredes celulares de estas bacterias. Las bacterias Gram positivas tienen muchas capas de peptidoglucano, las cuales a su vez, sostienen moléculas de ácido teicoico. El ácido teicoico reacciona con el cristal violeta y el yodo utilizado en este proceso de tinción. Un complejo de las moléculas cristal violeta-yodo-ácido teicoico es muy difícil de remover. Como la pared celular de las células Gram positivas retiene estos compuestos, es más difícil decolorar una célula Gram positiva que una Gram negativa. Una mezcla de alcohol remueve el cristal violeta de la célula Gram negativa, pero no de la Gram positiva. Esta mezcla de alcohol también disuelve mucho de la capa exterior de lipopolosacárido de la pared celular de la pared Gram negativa, lo cual acelera la remoción del colorante primario cristal violeta de estas células.

Cuando otro colorante, usualmente safranina o fucsina básica, se añade, las células Gram positivas siguen de color azul-violeta mientras que las Gram negativas absorben el color rojizo de la fucsina. Al final del procedimiento de tinción, las células Gram positivas serán del color del cristal violeta, o colorante primario, y las células Gram negativas serán del color de la fucsina que es el colorante de contraste.

**OBJETIVO:**

* El alumno realizara la técnica de tinción de Gram con la modificación de Reed.
* Diferenciara las bacterias Gram positivas de las Gram negativas.
* Explicará las diferencias estructurales de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

**MATERIALES**

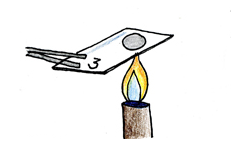
* Laminillas
* Plumón
* Asa bacteriológica
* Microscopio
* Mechero
* Aceite de inmersión
* Muestra de microorganismos
* Colorantes para la tinción de Gram
  + Cristal violeta
  + Bicarbonato de sodio
  + Solución de Yodo (lugol)
  + Alcohol-acetona
  + Fucsina básica

**MATERIAL POR EQUIPO**

* Guantes
* Cerillos o encendedor

**PROCEDIMIENTO**

1. Preparar frotis a partir de cada una de las muestras que tengas:
2. Colocar una gota de agua en el centro del portaobjetos
3. Esterilizar con el mechero el asa bacteriológica y enfriar con agua estéril
4. Tomar una pequeña porción de muestra con el asa estéril y colocarla en el portaobjetos con la gota de agua
5. Esparcir la muestra y el agua por el portaobjetos y secar al aire o con el mechero



1. Cubre al frotis con una solución de cristal violeta (colorante primario). Cubrir el área del frotis, una o dos gotas son suficientes. Agrega una cantidad igual de la solución de bicarbonato de sodio, la cual alcaliniza y acelera la tinción de las células. Deja actuar esta mezcla por **15 segundos**.



Lava con agua corriente (de la llave) a chorro de agua. Sacude la laminilla para eliminar las gotas de agua gruesas.

1. Aplicar la solución de yodo (lugol) y dejarla actuar durante **15 segundos.**

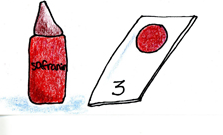


Lava con agua corriente de la llave. Sacude el frotis.

1. Aplicar el alcohol-acetona (agente decolorante) durante **5 segundos.**

Lava nuevamente con agua de la llave. Sacude la laminilla.

1. Agrega la fucsina básica (colorante de contraste) y déjala actuar **durante 5 segundos.**



Lava con agua corriente.

Seca el frotis por presión con una toalla absorbente o al aire, y observa al microscopio con el objetivo de inmersión (100x).

**¡RECUERDA!** Las bacterias Gram positivas se tiñen de color violeta mientras que las Gram negativas de rojo.

PREGUNTAS PARA EL REPORTE:

1. ¿Cuáles fueron las diferencias que encontraste en las dos muestras observadas?
2. Busca en la literatura, a los microorganismos observados en la práctica y compara tus resultados con lo reportado.
3. Si observaste alguna diferencia en cuanto a morfología o reacción a la tinción de Gram, trata de buscar alguna explicación.
4. Investiga qué tipo de variables pueden ocasionar que se obtengan resultados no deseables cuando se realiza una tinción de gram (por ejemplo que una bacteria Gram negativa se colore de morado).

